Caldasia 17 (1): 75-86, 1992

MODIFICACIONES TEGUMENTARIAS DE LARVAS Y ADULTOS DURANTE EL CUIDADO PARENTAL EN *MINYOBATES VIROLINENSIS* (AMPHIBIA: ANURA: DENDROBATIDAE)

Gloria R. De Pérez
Departamento de Biología, Facultad de Ciencias y Centro de Microscopía Optica y Electrónica, Universidad Nacional de Colombia, Santafé de Bogotá.

Pedro M. Ruiz-Carranza
Laboratorio de Anfibios, Instituto de Ciencias Naturales - Museo de Historia Natural, Apartado 7495, Universidad Nacional de Colombia, Santafé de Bogotá.

M. Patricia Ramírez-Pinilla
A.A. 078263 Santafé de Bogotá.

Resumen
Se realiza el estudio histológico y citológico del tegumento de la larva y del adulto durante el transporte del renacuajo por el macho de *Minyobates virolinensis.* Se observan modificaciones tegumentarias asociadas a este transporte en células del epitelio ventral del renacuajo. Se describen cuatro tipos celulares en la capa más externa de la epidermis de la larva; dos de éstos están asociados con la adhesión al adulto: el tipo celular I tiene un complejo de microvellosidades largas ancladas en la matriz intertegumentaria, el tipo II contiene gránulos de secreción en la superficie apical de las células y su secreción contribuye a formar esta matriz. Los otros dos tipos celulares son comunes en toda la superficie de la epidermis larval. La matriz intertegumentaria (glicoproteínas ácidas) prende al renacuajo sobre el dorso de la rana-nodriza. La epidermis de la rana-nodriza es similar a la de machos y hembras adultos sin renacuajos en el dorso; sin embargo, sobre la superficie de la piel de la rana-nodriza se acumulan varias capas córneas y dos tipos de glándulas mucosas secretan glicoproteínas ácidas a la matriz. Así, la matriz intertegumentaria posiblemente se origina tanto en el tegumento de la larva como en el del adulto.

Abstract
We studied the histology and cytology of the adult and tadpole skin during the transport of tadpoles by adult males of *Minyobates virolinensis.* Integumentary modifications associated with this transport are seen in cells of the ventral larval epithelium. Of the four cellular types observed in the outer layer of the larval epidermis, two are associated with the attachment to the adult: type I cells have a complex of long microvilli anchored in an intertegumentary matrix, and type II cells have several secretory granules at the apical cellular surface and their secretion contributes to form this matrix. The other two types are found throughout the surface of the larval epidermis. The intertegumentary matrix (acid glycoproteins) attach the tadpole to the nurse frog's back. The epidermis of the nurse frog is similar to that of adult males and females without tadpoles on the back; however, several corneal layers are accumulated on the skin surface of nurse frogs and two types of mucous glands secrete acid glycoproteins to the matrix. The intertegumentary matrix may originate from the tegument of both tadpole and adult.

Introducción

El conocimiento de factores de oviposición, lugar, características del huevo y de la postura, velocidad y duración del desarrollo, estado de desarrollo y tamaño en el momento de la eclosión, tamaño de la nidada y tipo de cuidado parental, constituye la base para definir modos reproductivos de los Anura y entender sus relaciones evolutivas (Salthe & Duellman, 1973).

Aunque en muchos anuros el modo reproductivo ha evolucionado independientemente en diferentes linajes filéticos, en otros casos el modo reproductivo es una faceta integral de la filogenia en grupos específicos teniendo entonces una gran significancia filogenética (Duellman, 1985). Varios autores han clasificado los modos de reproducción de los anuros (Crump, 1974; Lamote & Lescure, 1977; Duellman, 1978, 1985); el modo reproductivo considerado como más generalizado consiste en posturas y renacujos acuáticos; los demás modos de reproducción pueden ser derivados de esta forma primitiva e incluyen modificaciones en el desarrollo tanto morfológico como funcionales en los embriones y formas de cuidado parental en los adultos (Duellman, 1985).

El cuidado parental, definido como el comportamiento que permite a un individuo aumentar la supervivencia de las crías, en anuros es un aspecto importante de la biología reproductiva en formas con huevos no acuáticos (McDiarmid, 1978). El cuidado parental se manifiesta por la defensa de posturas arbóreas o terrestres y/o transporte de huevos o renacuajos por los adultos machos o hembras. Dentro de esta última forma de cuidado parental, una modalidad particular en la familia Dendrobatidae es el transporte sobre el dorso de los adultos a cuerpos de agua.

Después de la eclosión en sitios húmedos no inundados, los renacuajos son cargados por machos o hembras adultos; el transporte materno o paterno de los renacuajos puede relacionarse con diferencias interespecíficas en territorialidad (Wells, 1981). Los renacuajos se adhieren firmemente al dorso del adulto por un mucus que, como lo han sugerido Myers & Daly (1983), puede tener su origen en las glándulas mucosas del integumento del adulto. En la piel de los dendrobátidos, se reconocen morfológicamente los dos tipos comunes de glándulas integumentarias de los anuros: glándulas mucosas, y glándulas granulares que producen sustancias altamente tóxicas en algunas de las especies (Newirth *et al.*, 1979; Daly *et al*, 1987).

Observaciones en dendrobátidos permiten suponer que las larvas permanecen sobre el dorso del padre o la madre durante varios días; de esta manera el tegumento del adulto se asocia al comportamiento reproductivo de las especies con la consiguiente especialización de la piel del padre o de la cría, o de los dos, que asegure una adhesión firme entre ellos. En el presente trabajo se estudia la relación de los tegumentos padre-cría a nivel histológico y de estructura fina.

Materiales y métodos

Los ejemplares estudiados de *Minyobates virolinensis* (Ruiz-C. & Ramírez-P: 1992) proceden de la localidad típica de la especie. Cinco machos con larvas al dorso (ICN 16103-16107) se fijaron en glutaraldehído al 5% en amortiguador de Millonig pH 7.4 durante 6 horas; segmentos de piel de los machos con la larva adherida se postfijaron en tetróxico de osmio al 1% en el mismo amortiguador, se deshidrataron en etanol y finalmente fueron embebidos en mezcla de resina epón-araldita. Otro ejemplar (ICN 16108) en que el renacuajo se desprendió espontáneamente tres horas después de la captura, se realizó el mismo procedimiento a la piel dorsal del macho correspondiente a la zona de adhesión y a la cría completa. Para efectos comparativos se procesaron de manera similar segmentos de piel dorsal troncal posterior de dos machos y nueve hembras sexualmente adultos no portadores de renacuajos en condiciones naturales en el momento de la captura (machos ICN 16115-16116 y hembras ICN 16112, 16114, 16118-16120, 16146.

Para el estudio histológico se obtuvieron secciones semifinas (1μm) en un ultramicrótomo LKB 4801 y se colorearon con azul de toluidina. La identificación de sustancias glucoprotéicas se realizó utilizando ácido periódico de Schiff y azul de alcian (pH 2.5). Secciones ultrafinas de áreas de interés se estudiaron en un microscopio Jeol 100B, previa coloración con acetato de uranilo y citrato de plomo.

ICN = Número asignado dentro de las colección batracológica del Instituto de Ciencias Naturales-Museo de Historia Natural, Universidad Nacional de Colombia.

Resultados

PIEL DORSAL DE ADULTOS MACHOS Y HEMBRAS SIN LARVAS. La epidermis de ejemplares machos y hembras adultos de *Minyobates virolinensis* está compuesta por tres a cinco capas de células epiteliales incluida una córnea. En los estratos granular, espinoso y germinativo se observan algunos gránulos pequeños PAS positivos dispersos en el citoplasma de las células. Los núcleos tienen posición central, son esféricos y voluminosos; el carioplasma tiñe débilmente, en tanto que los nucleolos, generalmente dos, colorean con mayor intensidad. Linfocitos y neutrófilos son frecuentes en el epitelio. En la epidermis de varios ejemplares se encontraron varias células cebadas embebidas en el epitelio. Las células "flask cells" son escasas en las preparaciones estudiadas. El espesor de la epidermis es de 22 ± 7μm.

Al microscopio electrónico, las células columnares del estrato germinativo contienen cisternas de retículo endoplasmático rugoso (RER) y gránulos de glucógeno en todo el citoplasma; el citoesqueleto está conformado por tonofilamentos en diferentes direcciones; grupos de mitocrondrias rodean al núcleo, especialmente en la zona infranuclear. Las membranas de las células adyacentes corren paralelas y son rectas en la mayor parte de su curso, unidas por cortos desmosomas a los que convergen tonofilamentos. El espacio intersticial es reducido.

Al microscopio óptico se reconocen por lo menos dos estados de maduración y secreción de las glándulas mucosas. En primer lugar, glándulas con células columnares, algunas de ellas con abundantes gránulos de secreción glicoprotéica ácida liberados por exocitosis. La estructura fina de las células columnares muestra un desarrollo del RER en la región basal que sintetiza gránulos electrodensos de secreción que ocupan la mitad superior de las células. En segundo lugar, glándulas de epitelio cúbico, sin gránulos, ni evidencia de actividad secretora, en donde la reacción con PAS y azul de alcian es negativa.

Además se observó la presencia de un segundo tipo de glándulas de forma alveolar constituidas por pocas células planas y lumen amplio ocupado por un material granular fino, de reacción PAS y azul de alcian positivas (Fig. 1A). Al microscopio electrónico se constata que estas glándulas carecen de vaina de células mioepiteliales, sus células tienen citoplasma rico en RER y gránulos electrodensos, la luz glandular está totalmente ocupada por material glicoprotéico finamente granular (Fig. 1B).

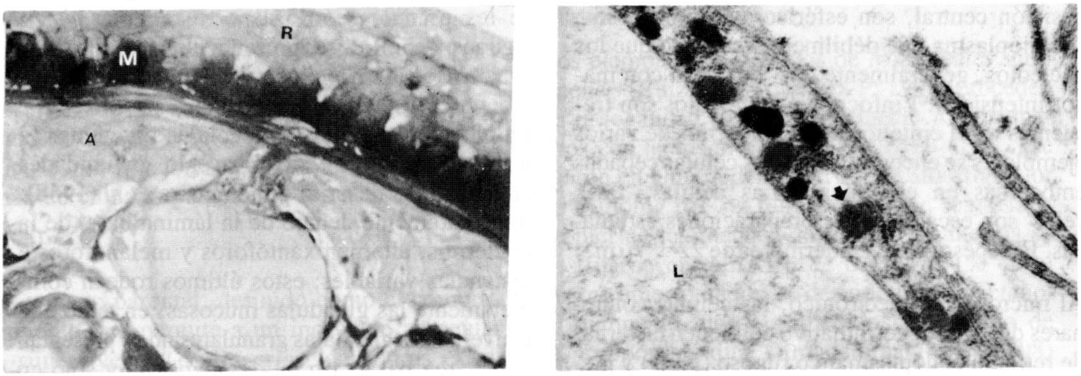
Las glándulas granulares son voluminosas y muy abundantes en todo el tegumento. El contenido de los gránulos es de aspecto reticular, y en algunos de ellos se presenta un área circular "vacía" localizada excéntricamente.

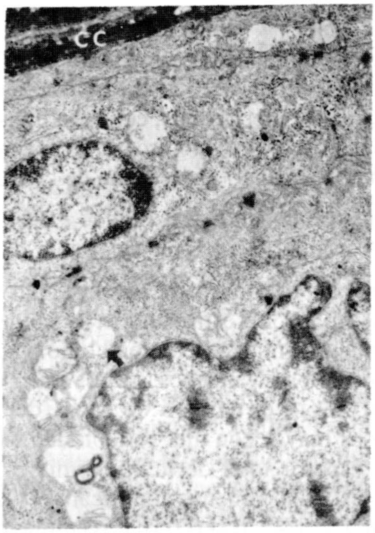
En el tejido esponjoso las células pigmentarias no siempre conservan el arreglo en unidades cromatóforas descrito por Bagnara *et al* (1968): inmediatamente debajo de la lámina basal de la epidermis, alternan xantóforos y melanóforos a distancias variables; estos últimos rodean completamente las glándulas mucosas, en tanto que a nivel de las glándulas granulares no se presentan en el área basal. En ciertas regiones y sólo en pequeños segmentos de la piel se presentan unidades cromatóforas típicas; los iridióforos no son claramente identificables al microscopio de luz y al microscopio electrónico aparecen como pequeñas células rodeadas por brazos de melanóforos.

El estrato compacto es semejante al de otros Anura. El tejido conectivo subcutáneo aloja capilares, nervios periféricos, células adiposas aisladas o en grupo y melanóforos de prolongaciones muy finas formando una cadena de células pigmentarias que rodean los nervios y las células adiposas.

TEGUMENTO DE ADHESIÓN DE MACHOS PORTADORES DE RENACUAJOS. La estructura de la epidermis y la dermis es similar a la región homóloga observada en hembras y machos adultos sin cría sobre el dorso. Sólo el número de capas del estrato córneo es mayor con una variabilidad entre 5 y 11. El espesor total de la epidermis es mayor siendo estadísticamente significativo ($\overline{X} = 36 \pm 8\mu m$, $t = 5.45$, $p = 0.05$). Las células córneas entran en contacto con las epiteliales planas por medio de uniones desmosómicas, éstas se han perdido entre las células de las capas córneas más externas. La estructura fina de las células epiteliales de los estratos germinativo, espinoso y granular presentan los mismos elementos descritos en adultos sin larvas al dorso; sin embargo, las mitocondrias presentan hinchamiento, desorganización, ruptura y pérdida de las crestas (Fig. 2). Las membranas celulares son poco contorneadas y unidas por cortos desmosomas.

El estrato esponjoso tiene numerosos capilares; las glándulas granulares y mucosas de los dos





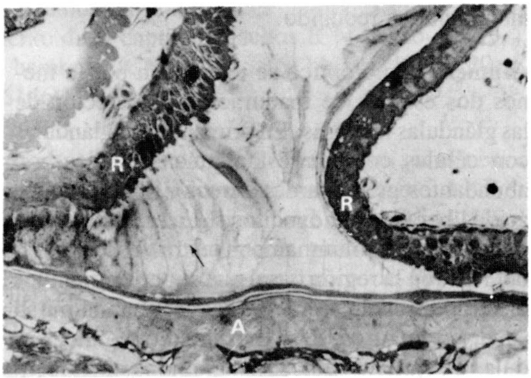


Figura 1.A. Fotografía al microscopio de luz de un área de la relación integumentaria larva-macho. Epidermis renacuajo (R), matriz intertegumentaria (M), epidermis del adulto (A). Se observa la glándula mucosa de células planas con lumen amplio ocupado por material glicoprotéico. 700x. **Figura 1.B.** Detalle de la ultraestructura de las células epiteliales planas de la glándula que muestra el citoplasma con RER y gránulos de secreción (flecha). Nótese la ausencia de envoltura mioepitelial y el lumen (L) ocupado por material glicoproteico finamente granular. 20000x. **Figura 2.** Estructura fina de células del estrato espinoso y plano de la epidermis de una rana-nodriza. Obsérvese el hinchamiento de las mitocondrias perinucleares y la ruptura de sus crestas (flecha), capas córneas (CC). 7500x. **Figura 3.** Vista parcial de la asociación del tegumento ventral de dos renacuajos (R) con el tegumento de la región dorsal posterior del macho (A). La matriz intertegumentaria tiene aspecto filamentoso (flecha). 280x. Grado de reducción del tamaño original de la figura 56.6%.

tipos antes mencionados son tan frecuentes en los machos adultos con cría como en machos y hembras adultos sin ellas; la dermis compacta no presenta variaciones histológicas o citológicas.

MATRIZ INTERTEGUMENTARIA ADULTO-LARVA. Al microscopio de luz, una matriz glicoprotéica ácida une la epidermis ventral de las larvas y la epidermis del adulto (Fig. 3). El área de la matriz en contacto directo con las capas córneas del adulto tiene una reacción PAS y azul de alcian más intensa. Al microscopio electrónico el material es finamente granular. Esparcidos o agregados dentro de la matriz se observan melanosomas, y a veces bacterias.

La matriz próxima a las células superficiales de la epidermis ventral de la larva está constituida por material filamentoso muy fino, proyecciones citoplasmáticas de estas células la penetran. En esta área los melanosomas se observan en mayor proporción.

ESTRUCTURA DEL TEGUMENTO VENTRAL DE LAS LARVAS. Tres o cuatro capas de células epiteliales poliédricas forman la epidermis ventral de la larva que está en contacto con la piel del organismo paterno por medio de la matriz. Al microscopio de luz la capa superficial se ve constituida por cuatro tipos celulares: tipo I, células en mayor proporción, de bordes apicales piramidales muy irregulares de donde se originan prolongaciones muy finas, proyectadas hacia la matriz; tipo II, células cuyo ápice contiene abundantes gránulos de secreción de naturaleza glicoprotéica; tipo III, células diferenciables por tener gránulos dispuestos en hilera inmediatamente por debajo de su membrana apical casi recta; y ocasionalmente se encuentran células ciliadas (tipo IV).

El estudio por microscopia electrónica revela diferencias en la ultraestructura de los cuatro tipos celulares: En las células del primer tipo, las delgadas proyecciones que se observan al microscopio de luz corresponden a un sistema complejo de microvellosidades electrodensas de longitud variable, que se origina en una base amplia; las de mayor extensión tienen ramificaciones secundarias, algunas flexuosas fusionadas o no por los extremos dan un aspecto reticular u horadado a esta área. Este sistema de microvellosidades penetra hasta ¾ partes el espesor de la matriz intertegumentaria y está asociado con el material filamentoso muy fino de la matriz (Fig. 4). La característica más sobresaliente del citoplasma de estas células es la distribución del RER en cisternas longitudinales en toda la superficie celular; en ocasiones se observan varias cisternas paralelas tachonadas de conspicuos ribosomas. Gránulos pequeños rodeados de un área clara y con una membrana periférica, de contenido medianamente electrodenso se distribuyen en el citoplasma; en la región apical de la célula dichos gránulos se ven asociados a haces de tonofilamentos del velo celular que penetran las microvellosidades; se observan también en el ápice celular ribosomas, polirribosomas y mitocondrias de crestas bien definidas. Las membranas de células adyacentes son poco plegadas, se unen en algunos sitios por medio de discretos desmosomas, y en la región apical por medio de zonas ocludens.

La región apical de las células tipo II se proyectan como una gran extensión citoplasmática ocupada por grandes gránulos de secreción de diferentes formas y tamaños rodeados por una membrana muy visible. Estas células tienen microvellosidades cortas en forma de cuerno. La figura 5 muestra la salida e incorporación de la secreción de un gránulo. Estos gránulos se diferencian de los encontrados en los de las células del primer tipo por su forma variada, su gran tamaño y su distribución masiva en la región apical de las células.

En las células del tercer tipo la membrana celular apical comparativamente recta, tiene microvellosidades cortas en forma de cuerno. Cuerpos multivesiculares (CMV) densos se localizan inmediatamente por debajo de ella. Los CMV de reacciones positivas PAS y azul del alcian, parecen originarse por fusión de vesículas desprendidas de los extremos de los sáculos del complejo de Golgi, de gran desarrollo en el área perinuclear (Fig. 6) y en donde las vesículas se reúnen en agregados. A nivel de la región media entre el núcleo y la superficie celular las vesículas han adquirido la estructura de CMV rodeados de membrana con los elementos constitutivos poligonales; el conjunto es electrolúcido; los CMV localizados en el ápice de las células se condensan haciéndose su matriz electrodensa. Al parecer el material producido por los CMV sale a la superficie celular, observándose residuos de ellos en los remanentes de la matriz de la larva desprendida del adulto y fijada unas horas después; algunos gránulos de secreción aislados se sitúan en el mismo nivel de los CMV por debajo de la membrana celular. El RER se presenta en cisternas longitudinales y perfiles transversales en todo el citoplasma; las mitocrondrias abundan en la región próxima a la membrana celular apical.

En las capas subyacentes, la mayor parte de las células epiteliales son ricas en organelos, tienen núcleo central grande y gránulos de pigmento. Las membranas de las células adyacentes son muy poco plegadas, salvo en algunas áreas en las que se ven grandes espacios intersticiales. En todos los casos las células se unen por medio de pequeños desmosomas. Sin embargo, algunas de las células tienen pocos organelos, citoplasma electrolúcido, glucógeno disperso y melanosomas. Las células de la capa germinativa descansan sobre una lámina basal bien diferenciada; del lado interno de la membrana celular en la región basal se observan numerosos hemidesmosomas espaciados a intervalos más o menos regulares. Los filamentos asociados a los hemidesmosomas se dirigen hacia arriba y hacia la periferia celular y se unen a densos haces de filamentos configurando los cuerpos de Eberth. Hacia la región central, el citoplasma tiene cisternas de RER, ribosomas libres, glucógeno, algunos melanosomas dispersos o en grupos, gotas de lípido y pequeñas mitocrondrias rodean el núcleo. En la epidermis ventral de la larva no fueron encontradas células de Leydig ni células de Merkel ni "flask cells".

En el tejido conectivo subyacente se observan fibroblastos, linfocitos, granulocitos y vasos sanguíneos embebidos en la matriz fundamental, pero no se hallaron células de pigmento.

La observación del tegumento de la larva desprendida del adulto tres horas después de la captura, muestra que las células especializadas de la capa superficial de la epidermis ventral (tipos I y II) sufren una regresión por proceso de autólisis, el citoplasma se vuelve electrodenso, hay disolución y pérdida de organelos, presencia de lisosomas y vacuolas fagocíticas, frecuentemente con melanosomas en el interior (Fig. 7). Los extremos de las microvellosidades más largas de la membrana apical se desprenden junto con la matriz. Estas células alternan en la superficie con otras de reemplazo que vienen de la capa media cuya estructura corresponde a las células del tercer tipo con formación de CMV.

PIEL DORSAL DE LAS LARVAS. En el estado de desarrollo 25 (*sensu* Gosner, 1960) la epidermis del dorso tiene dos capas de células columnares. Al microscopio óptico, las células del estrato externo tienen citoplasma pálido y la membrana apical presenta aspecto de borde estriado. Inmediatamente por debajo de la membrana apical estas células poseen gránulos de glicoproteínas. El citoplasma de las células de la capa basal colorea intensamente con PAS y azul de alcian; éstas al igual que las de la capa externa son cilíndricas y tienen núcleo central; el borde apical es convexo o ligeramente angular por la presión de las células de la capa externa. La forma de asociación de las células de la epidermis larval recuerda la relación que se observa en el estrato espinoso de los adultos de anuros, con membranas muy plegadas; los espacios intersticiales desarrollados, a diferencia de lo observado en la epidermis ventral.

Las células de Leydig son poco frecuentes. Se encontraron células de Merckel en la epidermis de la región lateral, lo cual hace suponer pueden existir también en la región dorsal; de cualquier manera estas células son escasas en la piel de los renacuajos.

Al microscopio electrónico las células de la capa germinativa de la epidermis dorsal son similares a las correspondientes de la piel ventral.

El citoplasma de las células de la capa externa es rico también en organelos: cisternas de RER distribuidas en todo el citoplasma, ribosomas libres, pequeñas mitocondrias ovoides y tonofilamentos. El aparato de Golgi rodea grupos de elementos vesiculares que se condensan formando CMV los cuales se sitúan en el borde apical interno de la célula. Pequeñas disrupciones de la membrana señalan los sitios de salida del contenido de estos organelos. En la figura 8 se observa la membrana celular apical con cortas y espaciadas microvellosidades electrodensas en forma de cuerno, tonofilamentos del ápice penetran al centro de ellas. Existe otro tipo de células claras que, a diferencia de las anteriores, son pobres en organelos (cisternas de RER, mitocondrias), pero también contienen haces de tonofilamentos. En la piel dorsal, la dermis tiene una estructura similar a la de la región ventral, pero en esta región se encuentran células de pigmento.

Discusión

En dendrobátidos el cuidado parental puede tener tres modalidades: protección de los huevos contra la desecación (*Dendrobates auratus, Dendrobates pumilio* y *Phyllobates vittatus,* Duellman & Trueb, 1986), nutrición de las larvas (*Dendrobates pumilio, Dendrobates histrionicus* y *Dendrobates lehmani* depositan huevos no fertilizados como dieta en el hábitat arbóreo de las larvas, Weygoldt, 1980; Zimmermann & Zimmermann, 1981), y transporte de los renacujos a fuentes de agua; esta última modalidad parece ser universal en la familia (McDiarmid, 1978), con la excepción de dos especies de dendrobá tidos en los que hay desarrollo directo (Crump, com. pers). Los renacuajos se prenden temporalmente al dorso de la hembra o del macho. El transporte materno vs. paterno estaría relacionado con diferencias interespecíficas en territorialidad (Duellman & Maness 1980; Wells, 1981); en algunos dendrobátidos está posiblemente asociado con cuidado materno subsiguiente. Se supone que el sexo de la rana-nodriza (machos en la mayoría de los casos y hembras solo en algunos casos) es un rasgo propio de las especies, y sólo en algunas ambos sexos transportan renacuajos, como resultado de la competencia entre sexos por el papel de nodriza (Myers & Daly, 1983). Los dendrobátidos son conocidos como especies territoriales, los machos que defienden un territorio restringido pueden proteger las posturas con poco esfuerzo; de otro lado, en especies en las que el macho es altamente territorial y cuida los huevos, es la hembra la que transporta los renacuajos al agua. En *Minyobates virolinensis* el transporte, máximo dos renacuajos por adulto, lo realizan solo los machos. Existen muchos interrogantes sobre el significado de este comportamiento, como por ejemplo acerca de los factores que favorecen el cuidado paterno o materno en direntes especies, tiempo durante el cual son transportados, o si el cuidado paterno interfiere con su habilidad para atraer parejas adicionales. Un alto grado de dedicación paterna a la protección de huevos o jóvenes puede conducir a una inversión de la responsabilidad en el comportamiento sexual. Las hembras pueden competir por los machos si la disponibilidad de éstos para la reproducción se disminuye por el cuidado parental, en cuyo caso son las hembras las que realizan el cortejo y exhiben agresividad y territorialidad (Wells, 1977, 1981). La territorialidad de hembras puede estar relacionada con factores ecológicos (humedad o lugares desfavorables para la alimentación), mientras que el cuidado parental del macho es probablemente una extensión de la defensa territorial de los sitios de oviposición, lo que a su vez puede estar relacionado con la fertilización externa (Wells, 1977; Duellman & Maness, 1980).

En grupos con fertilización interna usualmente es la hembra la que está asociada con la forma en desarrollo; el cuidado paterno ocurre especialmente cuando la fertilización y oviposición suceden en el territorio del macho (Wells, 1977; Duellman, 1985).

En *Minyobates virolinensis* el número de huevos por postura es pequeño, 2 a 3 (Ruiz-C & Ramírez-P, 1992), el macho transporta y cuida los renacuajos, probablemente también cuida los huevos, y la hembra sería territorial como en *Dendrobates auratus* (Wells, 1978).

El transporte de las larvas en Dendrobatidae es posible por la adhesión de su piel ventral a la epidermis del padre y/o la madre. Sin embargo, no se conocen estudios morfológicos acerca de la posible especialización que implica esta relación entre el tegumento de los dos organismos en la familia. Stebbins & Hendrickson (1959) señalan que el vientre del renacuajo se adhiere mediante un mucus pegajoso, y Myers & Daly

(1983) agregan que la adhesión se realiza en un substrato de mucus secretado por las glándulas de la piel de la rana-nodriza, facilitada por el vientre plano o ligeramente cóncavo de los renacuajos. En *Minyobates bombetes* el mucus se comporta como un pegante que hace difícil la liberación de los renacuajos y es posible que la rana- nodriza se sumerja durante un largo tiempo en el agua antes de que las larvas naden libremente (Myers & Daly, 1980). Según estos autores el grado de firmeza adhesiva parece estar correlacionado con el tiempo en que las larvas son transportadas por el adulto, rasgo que es muy variable en los dendrobátidos. Las crías pueden ser cargadas por el padre o la madre desde unas pocas horas hasta algo más de una semana; durante este período las larvas crecen absorbiendo reservas de vitelo; los padres pueden ir a cuerpos de agua donde se pierde la unión mucosa y los renacuajos nadar libremente.

Los renacuajos de *Minyobates virolinensis* se localizan en la región posterior de la espalda del adulto, posición común en el género *Minyobates*, con larvas relativamente grandes comparadas con el tamaño de los adultos (Myers & Daly, 1980). En *M. virolinensis* se constató una adhesión sólida de los renacuajos, ya que éstos no se desprendieron por efecto de la fijación por inmersión en glutaraldehído, único procedimiento para conservar intacta la relación tegumentaria adulto-larva, requerida para el estudio histológico y citológico. En un adulto mantenido vivo cerca de tres horas, la larva se desprendió al parecer más por "stress" que por inmersión en agua, habida cuenta las condiciones de transporte (vegetación húmeda en bolsa plástica).

El estudio histológico y citológico realizado, muestra una adaptación de algunas estructuras de la piel de la larva y del adulto en la región de adherencia: se establece un complejo estructural funcional epidermis larva-matriz-epidermis adulto. Células epiteliales ventrales de la capa más externa de la piel del renacuajo exhiben las trasformaciones más llamativas dado que en la mayoría de ellas el ápice celular papilar está altamente modificado por la presencia de un sistema complejo de microvellosidades que penetran asociándose profundamente con la matriz de aspecto filamentoso, y que contribuye a "anclar" el epitelio larval dentro de ella. Como se describió anteriormente, estas células poseen un citoplasma rico en organelos, su secreción y de la de las células tipo II contribuye de manera evidente al establecimiento y conservación de la matriz; además se señala la presencia de melanosomas dispersos embebidos en la matriz y que aparentemente proceden de las células de la epidermis larval, las cuales son ricas en éstos organelos. Es probable que los melanosomas sean elementos que interactúan como receptores específicos entre la forma juvenil y el adulto.

Alternan también en el epitelio ventral larval células epiteliales con el aparato de Golgi desarrollado, cuerpos multivesiculares (CMV) y algunos gránulos de secreción. La evidencia morfológica en las larvas de *Minyobates virolinensis* muestra que los CMV en formación están asociados con las vesículas que se liberan de los extremos del Golgi, las cuales se agregan y van configurando estados iniciales de formación de CMV. La electrodensidad y el tamaño de los CMV en las regiones supranuclear, citoplasmática en la región media entre el núcleo y el ápice celular, y aquellos que se sitúan inmediatamente por debajo de la membrana apical tienen características morfológicas que son utilizadas para definir estados secuenciales en la vida media de un organelo (Williams, 1987). Así, los CMV de mayor tamaño y menor electrodensidad corresponden a formas tempranas y los de menor tamaño y mayor electrodensidad localizadas bajo la membrana apical corresponderían a las formas tardías.

Los CMV no han sido mencionados en estudios de piel de larvas de anuros (p. ej. en Chapman & Dawson, 1961; Fox, 1977; 1981; Fox & Whitear, 1978). La presencia de fosfatasa ácida en pequeños lisosomas, vacuolas autofágicas y citolisosomas ha sido señalada sólo durante la prometamorfosis o durante el climax de la metamorfosis, en las que los niveles de enzimas lisosomales aumentan especialmente en la cola de la larva (Fox, 1981). Sin embargo, las ilustraciones del trabajo de Chapman & Dawson (1961, figuras 5 y 6) muestran una gran "vacuola secretora" asociada al Golgi y sugieren la participación de éste en la elaboración del producto secretor. Para estos autores, y para Fox (1977, Fig. 4), las vacuolas de este tipo que se observan por debajo de la membrana apical fueron interpretadas como gránulos de mucus que protege la superficie de la piel larval. El proceso de fijación de la piel para microscopía electrónica empleado por estos autores, distinto del utilizado aquí, podría ser responsable de la diferencia de la ultraestructura de las vesículas referidas y es posible que las estructurales por ellos denominadas vacuolas secretoras correspondan a CMV.

El origen y la función de estos organelos son aún muy controvertidos. Según Antenius (1974), Martín & Spicer (1973) y Locke & Sykes (1975) los CMV se originan del Golgi. Friend & Farquard (1967), y Friend (1969) mostraron que los CMV de las células del vaso deferente y del epidídimo de rata tienen actividad semejante a la de los lisosomas; las enzimas fueron demostradas por citoquímica en el compartimento de la membrana externa y las vesículas internas, si bien no todos los CMV contenían las mismas enzimas. Las vesículas internas fueron citoquímicamente similares a ciertas cisternas de Golgi.

No obstante, estudios recientes muestran la participación de los CMV el proceso de incorporación de complejos receptor-ligando, o en la entrada de nutrientes desde el espacio extracelular que influencian el metabolismo celular, o participan en respuestas inmunes. Las investigaciones de Goldstein *et al* (1985), Mackanna *et al.* (1984) y Hubbard (1982) ilustran estas funciones de los CMV y proponen su origen a partir de un proceso de endocitosis y fusión posterior de las vesículas así formadas.

La frecuencia de CMV observada en las células de la epidermis larval (ventral, lateral y dorsal) formados a partir del Golgi, y el hallazgo de enzimas lisosomales en CMV por algunos autores, sugiere que los CMV pueden tener una actividad enzimática y/o secretora de mucus. Así, el tipo celular III sería de ocurrencia común en la epidermis larval de anuros y no parece constituir una especialización para la adhesión de la epidermis ventral de la larva de *Minyobates virolinensis*. La presencia de abuntantes células con CMV, y su evidente relación morfológica con el complejo de Golgi, constituyen un excelente modelo para el estudio del origen y la función de estos organelos.

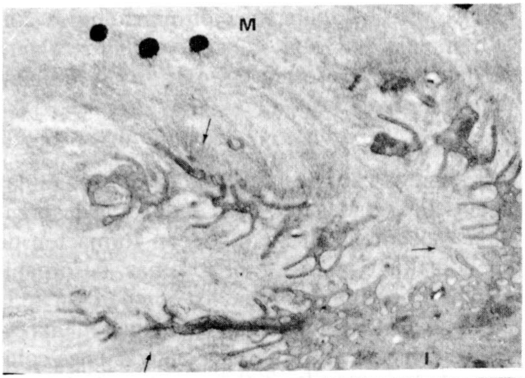
Los rápidos cambios observados en las células aquí denominadas tipo I y II en la larva desprendida (que implican autólisis con formación de vacuolas fagocíticas, citolisosomas, desorganización y pérdida de organelos con pérdida de la electrodensidad citoplasmática) sugieren una estrecha relación entre las especializaciones celulares de la epidermis del vientre larval y el proceso de adhesión al dorso paterno. Por el contrario, las células tipo III se conservan intactas y son para el tipo celular predominante, de manera similar al epitelio de la región dorsal.

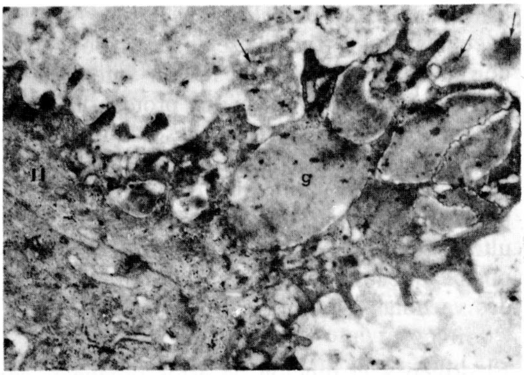
El número de capas córneas de la epidermis, que se observaron en los machos de *Minyobates virolinensis*, podría ser indicativo del tiempo de permanencia del renacuajo sobre el dorso paterno. El estudio del índice mitótico de la epidermis de los adultos de esta especie permitiría conocer con precisión este tiempo.

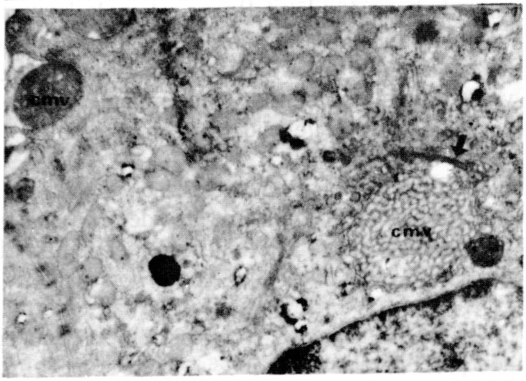
Glándulas mucosas como las encontradas en adultos machos y hembras de *Minyobates virolinensis* no han sido descritas en Dendrobatidae. La ausencia de envoltura mioepitelial sugiere que su secreción es continua. Estas glándulas parecen cumplir una función secretora adicional ya que producen un material glicoprotéico ácido de gránulos muy finos que es posible coadyude a la formación de la matriz y a su capacidad adhesiva. Entonces, la matriz de adhesión intertegumentaria adulto-larva puede ser el producto de la secreción de células especializadas de la larva y de las glándulas del adulto, lo cual parece confirmarse por las diferencias tinctoriales y de estructura fina de las regiones de la matriz respectivamente próximas a la epidermis larval y la epidermis del macho.

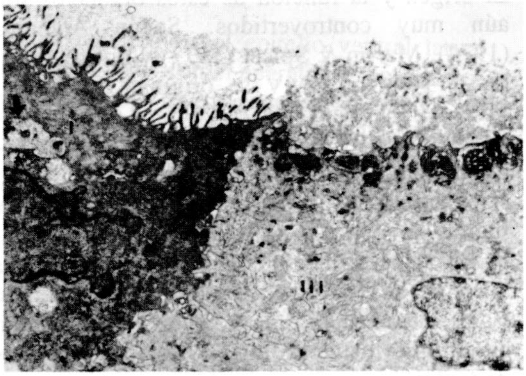
Agradecimientos

El CINDEC, la Facultad de Ciencias, el Centro de Microscopia óptica y electrónica, el Departamento de Biología y el Instituto de Ciencias Naturales-Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, dieron el apoyo y la financia-









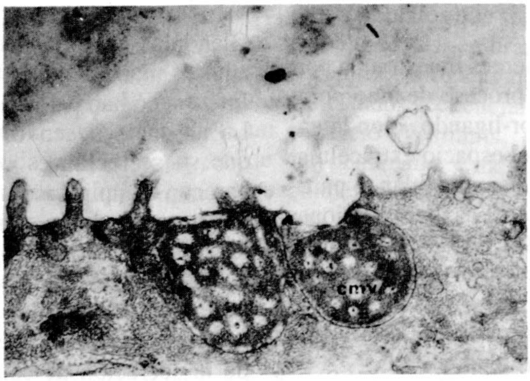


Figura 4. Región apical de las células tipo I (I) de la epidermis larval, se destacan las prolongaciones citoplasmáticas ramificadas (flechas) embebidas en la matriz (M) y asociadas a material filamentoso. Se observan melanosomas dispersos dentro de la matriz. 28000x. **Figura 5.** Apice de una célula tipo II (II) de la epidermis larval ocupado por grandes gránulos glicoprotéicos rodeados por una conspicua membrana (g). Se observa el producto de secreción recientemente incorporado a la matriz (flechas) y la membrana con cortas microvellosidades en forma de cuerno. 17000x. **Figura 6.** Golgi con vesículas estrechamente asociadas (flecha) a un cuerpo multivesicular en formación (cmv) en la región supranuclear de la célula. Nótese la electrodensidad de este último y la del cuerpo multivesicular localizado en la región apical de la célula (cmv). 11500x. **Figura 7.** Detalle de la estructura fina de células de la epidermis ventral de la larva desprendida del adulto. Se observa una célula tipo I (I) en proceso de autólisis con vacuola fagocíticas (flecha) y aumento de la electrodensidad, y una de las células tipo III (III) que conserva su apariencia normal. 7000x. **Figura 8.** Región apical de una célula de la capa externa de la epidermis dorsal de la larva que evidencia la presencia de cuerpos multiversiculares (cmv) y cortas microvellosidades en forma de cuerno de la membrana celular apical. 13000x. Grado de reducción del tamaño original de la figura 56.6%.

ción que hizo posible la realización de este trabajo. Se expresa un reconocimiento especial a la Profesora M. Cristina Ardila por su permanente colaboración.

Literatura citada

Antenius, A. 1974. Origin and fate of the multivesicular bodies in PHA stimulated lymphocytes. *Cell. Tiss. Res.* 149:497-511.

Bagnara, J.T., J.D. Taylor & M.E. Hadley. 1968. The dermal chromatophore unit. *J. C. Biol.* 38: 67-79.

Chapman, G.B. & A.B. Dawson. 1961. Fine structure of the larval anuran epidermis with special reference to the figures of Eberth. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 10: 425-435.

Crump, M. 1974. Reproductive strategies in a tropical anuran community. *Univ. Kansas Mus. Nat. Hist. Misc. Publ.* 61: 1-68.

Daly, J.W., C.W. Myers & N. Whittaker. 1987. Further classification of skin alkaloids from neotropical poison frogs (Dendrobatidae), with a general survey of toxic/noxius substances in the Amphibia. *Toxicon* 25(10): 1023-1095.

Duellman, W. 1978. The biology of an equatorial herpetofauna in Amazonian Ecuador. *Univ. Kansas Mus. Nat. Hist. Misc. Publ.* 65: 1-352.

—— 1985. Reproductive modes in anuran amphibians: Phylogenetic significance of adaptive strategies. *South African J. Sci.* 81: 174-178.

—— **& S.J. Maness.** 1980. The reproductive behavior of some hylid marsupial frogs. *J. Herpetol.* 14: 213-222.

—— **& L. Trueb.** 1986. *Biology of Amphibians.* McGraw Hill Book Co. New York. 670 pp.

Fox, H. 1977. The anuran tadpole skin: Changes occurring in it during metamorphosis and some comparisons with that of the adult. Pp. 269-289. *In* R.I. Spearman (ed.), *Comparative Anatomy of the skin.* Symp. Zool. Soc. London No. 39. Acad. Press, Londres.

—— 1981. Cytological and morphological changes during amphibian metamorphosis. pp. 327-362 *In* LO. I. Gilbert y E. Frieden (eds.), *Metamorphosis. A problem in Developmental Biology* 2da ed. Nueva York, Plenum Press.

—— **& M. Whitear.** 1978. Observations on Merckel cells in Amphibians. *Biol. Cell.* 1 32: 223-232.

Friend, D.S. 1969. Cytochemical staining of multivesicular body and Golgi vesicles. *J. Cell. Biol.* 41: 269-279.

—— **& M.G. Farquard.** 1967. Functions of coated vesicles during protein absorption in the rat vas deferens. *J. Cell. Biol.* 35: 357.

Goldstein, J.L., M.S. Brown, R.G. Anderson, D.W. Russell & W.J. Scheider. 1985. Receptor mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. *Ann. Rev. Cell. Biol.* 1: 1-39.

Gosner, K.L. 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica.* 16: 183-190.

Hubbard, A.L. 1982. Receptor-mediated endocytosis of asialoglycoproteins in the hepatocyte. *Ciba found Symp* 92: 109-112.

Lamote, M. & J. Lescure. 1977. Tendances adaptatives a l'affranchissement du milieu aquatique chez les amphibiens anoures. *Terre et la Vie* 2: 225-312.

Locke, M. & A.K. Sykes. 1975. The role of the Golgi complex in the isolation and digestion of organelles. *Tiss. Cell.* 7: 143-158.

Martin, B.J. & S.S. Spicer. 1973. Multivesicular bodies and related structures of the syncytiotrophoblast of human term placenta. *Anat. Rec.* 175: 15-36.

McDiarmid, R.W. 1978. Evolution of Parental Care in Frogs. Pp. 127-147 In G.M. Burkhardt y M. Bekiff (eds.), *The Development of Behavior: Comparative and Evolutionary Aspects,* Nueva York: STPM Press.

McKanna, J. A., H. T. Haigler & S. Cohen. 1984. Hormone receptor topology and dynamics: morphological analysis using ferritin-labeled epidermal growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81: 6383-6387.

Myers, C.W. & J.W. Daly. 1980. Taxonomy and ecology of *Dendrobates bombetes,* a new Andean poison frog with new skin toxins. *Amer. Mus. Nov.* 2692: 1-23.

—— **& J.W. Daly.** 1983. Dart poison frogs. *Sci. Amer.* 248(2): 120-133.

Newirth, M., J.W. Daly, C.W. Myers & L.W. Tice. 1979. Morphology of the granular secretory glands in skin of Poison-dart frogs (Dendrobatidae). *Tiss. Cell.* 11(4): 755-771.

Ruiz-C, P.M. & M.P. Ramírez-P. 1992. Una nueva especie de Minyobates (Anura: Dendrobatidae) de Colombia. *Lozania* 61: 1-16

Salthe, S.N. & W. Duellman. 1973. Quantitative constraints associated with reproductive mode in anurans. Pp. 229-249 *In* Vial, J.L. (ed.), *Evolutionary biology of the anurans: contemporary research on major problems.* Univ. Missouri Press, Columbia.

Stebbins, R.C. & J.R. H endrickson. 1959. Field studies of amphibians of Colombia, South America. *Univ. Calif. Publ. Zool.* 54: 497-540.

Wells, K.D. 1977. The social behavior of anuran amphibians. *Anim. Behav.* 25: 666-693.

—— 1978. Courtship and parental behavior in a Panamian poison-arrow frog (*Dendrobates auratus*). *Herpetologica* 34: 148-155.

—— 1981. Parental behavior in male and female frogs. Pp. 184-197, *In* D.R. Alexander & D.W Tinkle (eds.), *Natural selection and social behavior: Recent research and new theory,* Newton, Massachusetts, Chiron Press.

Weygoldt, P. 1980. Complex brood care and reproductive behavior in captive poison-arrow frogs, *Dendrobates pumilio. Behav. Ecol. Sociobiol.* 7: 329-332.

Williams, M.C. 1987. Vesicles within vesicles: what role do multivesicular bodies play in alveolar type II cells. *Am. Rev. Respir. Dis.* 135: 744-746.

Zimmermann, H. & E. Zimmermann. 1981. Sozialverhalten, Fortpflanzungsverhalten und Zucht der Fbarberfroshe *Dendrobates histrionicus* und *D. lehmanni* sowie einiger anderer Dendrobatiden. *Zeit. Kohlner Zoo* 24: 83-99.